

BREVET D'INVENTION

FR00/02202

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

4

COPIE OFFICIELLE

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 11 AOUT 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire ou bleue, lisiblement.

Reserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **30 JUIL. 1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9910095**
DEPARTEMENT DE DÉPÔT **L4**
DATE DE DÉPÔT **30 JUIL. 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET GERMAIN ET MAUREAU
B.P. 6153
69466 LYON CEDEX 06
FRANCE

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☐ demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent références du correspondant

MD/MK/B05B3441

numéro de téléphone

04 72 69 84 30

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Procédé de culture in vitro de virus des familles Togaviridae et Flaviviridae, lignée cellulaire et utilisations.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

1 - **BIO MERIEUX**

2 - **Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale**

Forme juridique

S.A.

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

1 - **Chemin de l'Orme - 69280 MARCY L'ETOILE**

2 - **INSERM, 101 rue de Tolbiac - 75654 PARIS Cedex 13**

Pays

FRANCE

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

Mireille DIDIER

CPI 971202

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

N. AMERIS

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 10095

TITRE DE L'INVENTION :

Procédé de culture in vitro de virus des familles Togaviridae et
Flaviridae, lignée cellulaire et utilisations

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

CABINET GERMAIN & MAUREAU
BP 6153
69466 LYON CEDEX 06
FRANCE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

ANDRE Patrice
6 rue Victor Basch
35700 RENNES

LOTTEAU Vincent
Le Bourg
71460 VAUX EN PRE

PARANHOS-BACCALA Glaucia
75 Cours Gambetta
69003 LYON

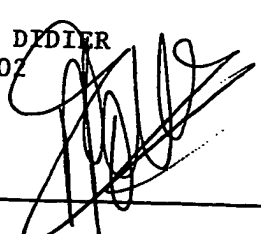
KOMURIAN-PRADEL Florence
114 Chemin du Pavillon
69250 POLEYMIEUX

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Lyon, le 22 Septembre 1999

Mireille DEDIER
CPI 971202



DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDEICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
p. 24				27.01.07	08. FEV 2007 - VD

La présente invention a notamment pour objet un procédé de culture et de propagation *in vitro* d'un virus à ARN impliqué dans le développement de pathologies humaines virales.

5 Le procédé de culture et de propagation de l'invention s'applique principalement aux virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae*. Ces virus présentent les caractéristiques communes d'être des virus enveloppés à ARN simple brin positif-sens, non
10 segmenté.

La famille des *Togaviridae* comprend les virus des genres *Alphavirus* et *Rubivirus*. Les virions ont un diamètre de 70 nm, sont sphériques et comportent une enveloppe et des péplomères composés d'un hétérodimère de
15 deux glycoprotéines. Le génome consiste en une molécule unique d'ARN simple brin de 9,7 à 11,8 kb. Les protéines structurales incluent une protéine de la capside et deux glycoprotéines d'enveloppe. Les virions contiennent des lipides dérivés des membranes cellulaires de l'hôte. La
20 réplication implique la synthèse d'un brin d'ARN complémentaire, qui sert de matrice pour la synthèse de l'ARN génomique. L'ARN génomique sert de matrice à un ARN intermédiaire de réplication, qui à son tour sert de matrice pour la synthèse d'ARNm et la production d'un
25 précurseur polyprotéique qui est clivé pour l'obtention des protéines structurales et non structurales. La réplication a lieu dans le cytoplasme et l'assemblage implique un bourgeonnement au travers la membrane.

Le virus Sindbis, les virus des encéphalites
30 équine (de l'est, de l'ouest, vénézuélienne), le virus chikungunya, le virus o'nyong-nyong, le virus Igbo Ora, le virus Ross River, le virus Mayaro et le virus Barmah Forest appartiennent au genre des *Alphavirus* et sont des agents pathogènes pour l'homme. Le virus de l'hépatite E
35 est actuellement classé dans le groupe des *Alphavirus*, bien qu'il soit non enveloppé et de plus petite taille. Le

virus de la rubéole qui est classé dans le genre des *Rubivirus* est également un agent pathogène pour l'être humain.

Dans la famille des *Flaviviridae* sont classés les virus des genres *Flavivirus* (flavivirus), *Pestivirus* (virus des maladies des muqueuses) et *Hepacivirus* (virus des hépatites C et G). Les virions sont sphériques avec un diamètre de 45 à 60 nm de diamètre et sont constitués d'une bi-couche lipidique enveloppant une capside 5 icosaédrique enfermant le génome. Le génome consiste en une molécule unique d'ARN linéaire simple brin, positif-sens de 10,7 kb pour les flavivirus, 12,5 kb pour les pestivirus et 9,5 kb pour le virus de l'hépatite C. Les virions contiennent deux ou trois protéines associées à la 15 membrane et une protéine core. Les virions contiennent des lipides dérivés des membranes cellulaires de l'hôte. Ils contiennent des carbohydrates sous la forme de glycolipides et de glycoprotéines. La réplication implique la synthèse d'un ARN complémentaire qui sert de matrice 20 pour la synthèse de l'ARN génomique. Une trame de lecture unique (ORF) code pour une polyprotéine qui est clivée par protéolyse virale et cellulaire. Les protéines structurales sont codées par l'extrémité 5' et les protéines non structurales sont codées par l'extrémité 3' 25 de l'ARN. La réplication a lieu dans le cytoplasme et l'assemblage implique le passage et l'enveloppement par les membranes du réticulum endoplasmique de l'hôte. La réplication est accompagnée par un aspect caractéristique de prolifération des membranes intracellulaires.

30 Le virus de la fièvre jaune, le virus de la dengue, le virus de l'encéphalite japonaise, le virus de West Nile, le virus de l'encéphalite de St Louis, le virus de la Vallée de Murray, les virus de l'encéphalite transmise par les tiques et le virus de la 35 méningoencéphalite de la dinde d'Israël appartiennent au

genre des *Flavivirus* et sont des agents pathogènes pour l'homme.

Le virus de la diarrhée bovine, le virus du choléra du porc et le virus « border disease » du mouton appartiennent au genre des *Pestivirus*.

Quant au genre *Hepacivirus*, il regroupe actuellement les virus de l'hépatite C et de l'hépatite G (GBV-C et les virus GBV-A et GBV-B) qui sont bien connus pour être des agents infectant l'homme.

En effet, l'hépatite C est la cause principale des hépatites acquises par transfusion. L'hépatite C peut également être transmise par d'autres voies percutanées, par exemple par injection de drogues par voie intraveineuse. Le risque de contamination des professionnels de la santé n'est par ailleurs pas négligeable.

L'hépatite C se distingue des autres formes de maladies du foie associées à des virus, telles que les hépatites A, B ou D. Les infections par le virus de l'hépatite C (HCV ou VHC) sont souvent chroniques avec pour résultante des maladies du foie, telles que hépatite, cirrhose et carcinome dans un grand nombre de cas.

Bien que le risque de transmission du virus par transfusion ait diminué du fait de la sélection des donneurs de sang, la fréquence des hépatites C reste élevée. Actuellement, environ 170 millions de personnes à travers le monde sont infectées de manière chronique par HCV. Les populations à risque élevé se trouvent principalement chez les transfusés et les utilisateurs de drogues intraveineuses, mais il existe des donneurs de sang asymptomatiques qui n'appartiennent pas à ces groupes à risque élevé et chez lesquels des anticorps anti-HCV circulants ont été retrouvés. Pour ces derniers, la voie de l'infection n'a encore pas été identifiée.

HCV a été le premier virus hépatotrope isolé au moyen des techniques de biologie moléculaire. Les

séquences du génome viral ont été clonées avant que la particule virale ait été visualisée.

HCV est un virus à ARN simple brin positif, de 9,5 kb, qui se réplique par une copie d'ARN complémentaire et dont le produit de la traduction est un précurseur d'une polyprotéine unique d'environ 3 000 acides aminés. L'extrémité 5' du génome de HCV correspond à une région non traduite adjacente aux gènes qui codent pour les protéines structurales, la protéine core de la nucléocapside et les deux glycoprotéines d'enveloppe, E1 et E2/NS1. La région non traduite 5' et le gène core sont relativement bien conservés dans les différents génotypes, mais les protéines d'enveloppe E2 sont codées par une région hypervariable différente d'un isolat à un autre isolat. L'extrémité 3' du génome de HCV contient les gènes qui codent pour les protéines non structurales (NS) et pour une région 3' non codante bien conservée.

Du fait de son organisation génomique et de son mode présumé de réplication, HCV a été classifié dans un nouveau genre de la famille des *Flaviviridae*, les *Hepacivirus*.

De nombreuses techniques ont été développées pour diagnostiquer une infection par HCV. Par exemple, des essais immunologiques de diagnostic ont été réalisés pour détecter des anticorps dirigés contre des protéines de HCV dans les sérums de patients. La synthèse d'ADNc par transcription inverse de l'ARN viral et l'amplification par PCR ont également été utilisées pour détecter le génome de HCV, comme la mesure indirecte d'un virus potentiellement infectieux dans les sérums d'humains infectés de manière chronique ou ceux de chimpanzés infectés expérimentalement. Par ailleurs, sur la base du clonage de gènes, des techniques d'hybridation avec une sonde ADN ont également été développées.

Cependant, il est reconnu que les techniques de diagnostic existantes manquent de sensibilité et/ou de

spécificité et/ou souffrent de difficultés de mise en oeuvre. A titre d'exemple, avec la méthode d'hybridation de sondes il est impossible de faire la distinction entre un virus à faible pouvoir infectieux et un virus à pouvoir infectieux élevé. Il est donc nécessaire, mais difficile à mettre en oeuvre, d'inoculer le virus devant être testé à un chimpanzé et de tester l'infection résultante sur l'animal.

Il est donc de toute première importance, d'un point de vue de santé publique, de pouvoir développer des méthodes spécifiques, sensibles et pratiques pour identifier et cribler les porteurs de HCV. Une des solutions pourrait être de réaliser un système de culture *in vitro* très efficace de HCV qui permettrait d'obtenir une propagation du virus, en particulier pour étudier ses mécanismes de réplication, pour tester des anticorps neutralisants ou des antiviraux, de même que pour développer des matériaux biologiques, des essais de diagnostic et des préparations vaccinales. En effet, bien que la séquence complète de HCV soit disponible depuis 1989 (Q. L Choo et al., Science 244, 359 (1989)), la compréhension du cycle de vie et du mode de réplication d'HCV a été entravée par manque d'un système de culture *in vitro* approprié. Ito et al. (J. Gen. Virol. 77 : 1043-1054 (1996)) ont bien confirmé le maintien de la réplication de HCV dans des cultures primaires d'hépatocytes humains, obtenus à partir de patients porteurs de HCV et pour lesquels la maladie était établie de manière chronique, et suggéré un passage d'infection, mais des problèmes relatifs à la propagation du virus subsistent (impossibilité de culture au long cours) et le système développé est limité par la nécessité d'approvisionnement en foie humain et la lourdeur de la technique. Par ailleurs, à ce jour, il n'y a pas de consensus général sur le tropisme de HCV et tous les récepteurs cellulaires pour le virus n'ont pas encore été identifiés, notamment les

récepteurs permettant l'endocytose du virus (Pileri et al., 1998, Science, 282, pages 938-941).

HGV est un virus qui a été découvert de manière indépendante par deux équipes différentes, l'une l'a
5 appelé HGV et l'autre GBV-C. Il possède une structure génomique proche de celle des flavivirus. Sa polyprotéine de 2 900 acides aminés est codée par un ARN de 9 400 nucléotides dont l'extrémité 5' code pour des protéines structurales (nucléocapside tronquée et enveloppe) et
10 l'extrémité 3' code pour des protéines qui ont un rôle dans la réplication. Il est transmis par transfusion sanguine et peut être détecté chez des patients qui présentent des hépatites aiguës, chroniques et fulminantes. Sa contribution dans des maladies du foie
15 aiguë et chronique est encore mal connue. GBV-A et GBV-B ont également été décrits et sont très proches de HGV.

Dans le plasma de patients infectés par HCV sont retrouvées des particules contenant de l'ARN viral très hétérogènes en densité. Cette hétérogénéité de densité des
20 particules contenant de l'ARN viral est attribuée à leur association en proportion variable avec des lipoprotéines (Thomsen et al., 1993, Med. Microbiol. Immunol. 182 : 639). Dans la description de la présente demande de brevet, les inventeurs ont dénommé ces particules hybrides
25 LVPs (lipo-viro-particules). La répartition de chacune de ces formes le long d'un gradient de densité varie d'un patient à l'autre. Les analyses existantes des particules de faible densité montrent des densités recouvrant celles des LDLs (Low Density Lipoproteins) et des VLDLs (Very Low
30 Density Lipoproteins). La taille décrite (50 nm) les rapprochent des VLDLs. Par ailleurs, les particules peuvent être précipitées, parfois même dans leur totalité, par des sérums anti- β -lipoprotéines (Thomsen et al., 1992, Med. Microbiol. Immunol. 181 : 293 ; Prince et al., 1996,
35 J. Viral. Hepat. 3 : 11).

Il a également été observé que le virus de l'hépatite G peut être précipité, en quasi-totalité, par des sérums anti- β -lipoprotéines obtenus à partir de patients chroniquement infectés par HGV (Sato et al. 5 Biochem. Biophys. Res. Commun. 229 :719).

Il a par ailleurs été observé que l'infection par HCV d'hépatocytes humains s'accompagne d'une accumulation intracytoplasmique de vésicules lipidiques. La transfection du gène de HCV codant pour la capsidie dans 10 une lignée continue d'hépatocytes humains (Hep/G2) induit le même phénomène (Barba et al., 1997, PNAS 94 :1200). Ces vésicules sont riches en triglycérides. La protéine de capsidie de HCV est accolée à la surface des vésicules, de même que l'apolipoprotéine apo A-II.

15 Les apolipoprotéines permettent le transport des lipides en apportant une stabilité structurelle et une solubilité aux particules lipoprotéiques auxquelles elles sont associées. Elles déterminent aussi le sort de ces particules dans le métabolisme, notamment en les ciblant 20 sur des récepteurs.

Apo B 100 est l'apolipoprotéine principale des VLDLs, LDLs et IDLs (Intermediate Density Lipoproteins). Elle est synthétisée dans le foie et est essentielle pour l'assemblage et la sécrétion des VLDLs à partir du foie. 25 Elle constitue également un ligand pour la liaison des LDLs à leurs récepteurs. Un des récepteurs des LDLs, le LDL-récepteur, est une protéine de surface des cellules qui lie et internalise les lipoprotéines riches en cholestérol qui contiennent apo B 100 et apo E. Apo E est 30 principalement synthétisée dans les hépatocytes. Elle constitue un ligand pour la liaison de différentes lipoprotéines au récepteur des LDLs et au LRP (LDL-receptor-related protein).

Apo B 48 est essentielle pour l'assemblage et la 35 sécrétion des chylomicrons. Elle est codée par le même gène et le même ARNm que apo B 100, mais dans l'intestin

une mutation introduit un codon stop de sorte que apo B 48 contient seulement 48% de la longueur totale de apo B 100. Son rôle dans le métabolisme des chylomicrons dans le plasma est mal connu, mais les individus qui présentent des mutations qui interfèrent avec sa synthèse normale n'ont pas, ou ont des niveaux très faibles, de chylomicrons, VLDLs, IDLs et LDLs.

La nature des LVPs précitées contenant de l'ARN viral n'est à ce jour pas connue, mais les présents inventeurs ont émis l'hypothèse et vérifié qu'au moins un des récepteurs de surface cellulaire des lipoprotéines participe à l'infection et la propagation des virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae* dans une culture cellulaire. Ils ont en effet montré que les LVPs sont des ligands pour une voie d'endocytose associée à des récepteurs, préférentiellement pour le LSR (Lipolysis-Stimulated Receptor) (Frances T. Yen et al., *Biochemistry*, 1994, 33, 1172-1180 et Bernard E. Bihain and Frances T. Yen, *Biochemistry*, 1992, 31, 4628-4636).

Sur cette base, ils ont développé un nouveau procédé qui permet la culture, la propagation et la répllication *in vitro* de virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae*. Ce procédé, qui permet d'obtenir une propagation de ces virus, est utile notamment pour étudier leurs mécanismes de répllication, pour tester des anticorps neutralisants et des antiviraux, pour développer des matériaux biologiques pour le diagnostic et la thérapie. Par ailleurs, comme l'invention concerne également une lignée cellulaire infectée, celle ci est également utile pour cribler et/ou sélectionner au moins une molécule anti-virale, par mise en contact de la lignée cellulaire infectée et de la molécule anti-virale.

Selon ce procédé, on dispose d'au moins une fraction de LVPs obtenue à partir de sérum ou de plasma d'un patient infecté par un virus appartenant à la famille des *Togaviridae* ou *Flaviviridae*, on met en contact,

pendant un temps prédéterminé dans un milieu de culture approprié, ladite fraction de LVPs avec des cellules permissives qui possèdent une voie d'endocytose relayée par au moins un récepteur des lipoprotéines et susceptible
5 d'être modulée entre autre par un agent activateur, de préférence choisi parmi les acides gras insaturés, les dérivés d'acides gras insaturés comprenant de 16 à 20 atomes de carbone et leurs mélanges.

Le récepteur des lipoprotéines est le LSR et/ou le
10 récepteur de surface des LDLs et avantageusement lesdites cellules permissives possèdent les deux récepteurs.

L'acide gras insaturé est choisi parmi l'acide oléique, l'acide palmitoléique, l'acide linoléique, l'acide linolénique, l'acide arachidonique, l'acide trans-
15 hexadécénoïque et l'acide élaïdique ou leurs dérivés. Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l'acide gras retenu est l'acide oléique qui est ajouté au milieu de culture à une concentration comprise entre 0,1 et 1 mM, de préférence 0,5 mM.

20 Les cellules sont de préférence des cellules choisies parmi les cellules d'hépatocytes humains ou animaux, le groupe des lignées cellulaires d'hépatocarcinome humain ou animal, les cellules dendritiques, les cellules macrophagiques, les cellules de
25 Kupffer et leurs combinaisons associées ou non à des lymphocytes. Avantageusement, ces cellules sont des cellules d'hépatocarcinome humain de la lignée cellulaire PLC/PRF/5.

Préférentiellement, le milieu de culture comprend
30 outre les ingrédients nécessaires à la culture et l'agent activateur, au moins un agent modulateur de l'apoptose. Cet agent modulateur de l'apoptose est choisi parmi les interférons, les anti-interférons, en particulier les anti-interférons alpha et beta, les anti-caspase 3, en
35 particulier des analogues peptidiques, tels que le z-VADfmk, c'est à dire la N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-

fluorométhylcétone, et les anticorps dirigés contre les anti-caspase 3.

En effet, les présents inventeurs ont observé que chez des patients infectés à la fois par HIV et par l'*Hepacivirus* HCV, la prise de certains inhibiteurs de la protéase du HIV, tels que le Ritonavir (nom commercial) entraîne une augmentation de la virémie HCV associée à la cytolyse hépatique. L'observation d'une cytolyse hépatique aussitôt après la prise d'un médicament qui, en plus de son activité anti-protéasique, modifie également la régulation de l'apoptose est évocatrice d'une induction du signal d'apoptose. C'est pourquoi, il est intéressant d'ajouter dans le procédé de l'invention au moins un agent modulateur de l'apoptose.

Le milieu approprié retenu est en particulier choisi parmi le milieu DMEM ou un milieu dérivé du milieu DMEM et milieu RPMI ou un milieu dérivé du milieu RPMI. De préférence, c'est un milieu dérivé du milieu DMEM qui comprend le milieu DMEM complet commercialisé par la société Gibco BRL, complémenté par 0 à 10 mM de pyruvate de sodium, 0 à 10 % d'acides aminés non essentiels, 1 à 10 mM de glutamine, 100 à 200 U/ml de pénicilline, 100 à 200 mg/ml de streptomycine et 1 à 20 % de sérum de veau.

Ce milieu avantageusement comprend de plus 0,1 à 0,5% de BSA (Albumine Sérique de Bovin) ou de HSA (Albumine Sérique Humaine) couplée à un acide gras, selon la méthode de Dixon et al., 1991, Journal of Biological Chemistry, vol. 266, p 5080.

Dans un mode de réalisation préféré du procédé de l'invention, préalablement à la mise en contact des cellules permissives avec la fraction de LVPs, les cellules permissives sont lavées dans un tampon PBS préchauffé à une température d'environ 37°C.

On réalise plusieurs passages des cellules permissives ainsi infectées dans les conditions décrites ci-dessus et on met en évidence la présence dudit virus

dans les cellules permissives infectées et dans le surnageant de culture par RT-PCR et/ou par une technique immunologique, telle que immunofluorescence indirecte à l'aide d'un anticorps spécifique dudit virus et/ou par
5 cytométrie de flux.

Le procédé de culture, de propagation et de réplication décrit précédemment est particulièrement bien adapté à la culture, la propagation et la réplication des virus appartenant à la famille des *Flaviviridae* et au
10 genre *Hepacivirus*, en particulier les virus de l'hépatite C et de l'hépatite G, incluant les virus GBV-A, GBV-B et GBV-C, pour lesquels il n'existait pas à ce jour de procédé de culture efficace.

L'invention a également pour objet un milieu de culture pour la culture de virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae*, lequel milieu comprend le milieu DMEM complet commercialisé par la société Gibco BRL, complémenté par 0 à 10 mM de pyruvate de sodium, 0 à 10 % d'acides aminés non essentiels, 1 à 10 mM de
20 glutamine, 100 à 200 U/ml de pénicilline, 100 à 200 mg/ml de streptomycine et 1 à 20 % de sérum de veau. Ce milieu avantageusement comprend de plus 0,1 à 0,5% de BSA (Albumine Sérique de Bovin) ou de HSA (Albumine Sérique Humaine), couplée à un acide gras, selon la méthode citée
25 en référence ci dessus.

L'invention a aussi pour objet une lignée cellulaire infectée par au moins un virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae*, dans laquelle les cellules dans la lignée cellulaire sont des cellules
30 permissives qui possèdent une voie d'endocytose relayée par au moins un récepteur des lipoprotéines, susceptible d'être modulée entre autre par un agent activateur, lesdites cellules étant capables de propager et répliquer le virus. Préférentiellement, le récepteur est le LSR
35 et/ou le récepteur des LDLs et avantageusement les cellules permissives possèdent les deux récepteurs.

En particulier, la lignée cellulaire est une lignée dans laquelle les cellules sont dérivées par infection d'une cellule choisie parmi les cellules primaires d'hépatocytes humains ou animaux, les cellules du groupe des lignées cellulaires d'hépatocarcinome humain et animal, en particulier une cellule provenant de la lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain PLC/PRF/5 qui possède un récepteur de surface des lipoprotéines activable par des acides gras, les cellules dendritiques, les cellules macrophagiques et les cellules de Kuppfer. Mais, l'invention n'est pas limitée à une cellule d'une lignée cellulaire qui possède au moins le récepteur de surface LSR des lipoprotéines et englobe les cellules transfectées ou transformées qui sont capables d'exprimer à leur surface le récepteur LSR et/ou le récepteur des LDLs. La lignée cellulaire infectée obtenue selon le procédé de l'invention est utilisable pour cribler et/ou sélectionner au moins une molécule anti-virale selon lequel on met en contact la molécule anti-virale et la lignée cellulaire infectée.

L'invention concerne encore un procédé pour préparer une composition pour la détection dans un échantillon d'anticorps dirigés contre au moins un virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae* qui comprend au moins une purification partielle ou totale des particules virales dudit virus ou des polypeptides obtenus à partir d'une lignée cellulaire telle que définie précédemment. En particulier, lesdites particules virales ou lesdits polypeptides sont fixés sur un support solide.

Par ailleurs, l'invention concerne un procédé pour l'obtention d'anticorps ou de fragments d'anticorps dirigés contre au moins un virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae* selon lequel on immunise un animal avec des particules virales ou des polypeptides obtenus à partir d'une lignée cellulaire telle que définie précédemment. La production d'anticorps polyclonaux et

monoclonaux ou de fragments d'anticorps fait partie des connaissances générales de l'homme du métier. On peut citer à titre d'exemple Köhler G. et Milstein C. (1975) Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, 256 : 495-497 et Galfre G. et al. (1977) *Nature*, 266 : 522-550 pour la production d'anticorps polyclonaux et Roda A., Bolelli G.F. Production of high titer antibody to bile acids, *Journal of Steroid Biochemistry*, Vol. 13, pp 449-454 (1980) pour la production d'anticorps polyclonaux. Des anticorps peuvent être produits par immunisation de souris ou de lapins avec les particules virales ou les polypeptides obtenus selon le procédé de l'invention. Pour la production d'anticorps monoclonaux, l'immunogène peut être couplé à de l'hémocyanine de Lymphet Keyhole (peptide KLH) comme support pour l'immunisation ou à de l'albumine sérique (peptide SA). Les animaux sont soumis à une injection d'immunogène en utilisant de l'adjuvant complet de Freund. Les sérums et les surnageants de culture d'hybridome issus des animaux immunisés sont analysés pour leur spécificité et leur sélectivité en utilisant des techniques classiques, telles que par exemple des tests ELISA ou de Western Blot. Les hybridomes produisant les anticorps les plus spécifiques et les plus sensibles sont sélectionnés. Des anticorps monoclonaux peuvent également être produits *in vitro* par culture cellulaire des hybridomes produits ou par récupération de liquide d'ascite, après injection intrapéritonéale des hybridomes chez la souris. Quel que soit le mode de production, en surnageant ou en ascite, les anticorps sont ensuite purifiés. Les méthodes de purification utilisées sont essentiellement la filtration sur gel échangeur d'ions et la chromatographie d'exclusion ou l'immunoprécipitation. Un nombre suffisant d'anticorps sont criblés dans des tests fonctionnels pour identifier les anticorps les plus performants. La production *in vitro* d'anticorps, de

fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps, tels que des anticorps chimères produits par génie génétique est bien connue de l'homme du métier.

Plus particulièrement, par fragment d'anticorps on entend les fragments F(ab)2, Fab, Fab', sFv (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology 159 : 5821-5833 et Bird et al., 1988, Science 242 : 423-426) d'un anticorps natif et par dérivé on entend, entre autres, un dérivé chimérique d'un anticorps natif (voir par exemple Arakawa et al., 1996, J. Biochem 120 : 657-662 et Chaudray et al., 1989, Nature 339 : 394-397).

L'invention concerne aussi une composition diagnostique comprenant au moins les particules virales ou les polypeptides obtenus selon le procédé de l'invention ou les anticorps obtenus selon le procédé défini précédemment et un kit de diagnostic comprenant entre autre ladite composition, ainsi qu'une composition vaccinale comprenant au moins les particules virales ou les polypeptides éventuellement associés à un véhicule et/ou à un excipient et/ou à un adjuvant pharmaceutiquement acceptable. Mais, l'invention ouvre également d'autres perspectives thérapeutiques en ce qu'elle permet de développer une composition thérapeutique susceptible d'influencer de manière qualitative et/ou quantitative la propagation et la réplication des virus précités *in vivo* parce qu'elle comprend entre autre un ligand susceptible de moduler, de réprimer ou d'inhiber la voie d'endocytose relayée par au moins un des récepteurs des lipoprotéines, le ligand étant choisi parmi un anticorps antagoniste dirigé contre ledit récepteur dont la production est à la portée de l'homme du métier comme décrit ci-dessus et une protéine non naturelle, c'est à dire une protéine soluble obtenue par recombinaison génétique ou un polypeptide de synthèse soluble se liant audit récepteur ou en ce qu'elle comprend entre autre au moins une molécule qui module, réprime ou inhibe

l'expression du gène codant pour ledit récepteur ou l'activité du promoteur du gène qui code pour ledit récepteur.

Enfin, l'invention a pour objet un procédé pour
5 cribler et/ou sélectionner au moins une molécule anti-virale selon lequel on met en contact ladite molécule anti-virale et une lignée cellulaire infectée telle que définie précédemment.

Le terme virus appartenant aux familles des
10 *Togaviridae* et *Flaviviridae* tel qu'utilisé dans l'invention fait référence à toute espèce virale parmi lesquelles les souches pathogènes pour l'homme, les souches variantes, les souches atténuées et les souches défectives dérivées desdites souches. En effet, il est
15 connu que les virus à ARN présentent un taux de mutations spontanées élevé. Il peut donc exister des souches multiples qui peuvent être plus ou moins virulentes. Il est à la portée de l'homme de l'art d'identifier de telles souches, par exemple par homologie de séquences nucléiques
20 et/ou peptidiques par rapport à une souche de référence et/ou en identifiant une souche ou un isolat par rapport à des critères morphologiques et/ou immunologiques.

Le terme lignée cellulaire fait référence à une culture de cellules permissives dans laquelle le virus se
25 propage après une première culture et comprend donc, mais n'est pas limité, aux cellules individuelles, aux cellules récoltées et aux cultures contenant les cellules dans la mesure où elles sont dérivées de cellules de la lignée cellulaire de référence. Il est connu que des changements
30 spontanés ou induits peuvent survenir au niveau du caryotype durant le stockage ou le transfert. Donc, les cellules dérivées de la lignée cellulaire de référence peuvent ne pas être strictement identiques aux cellules ou cultures d'origine et la lignée cellulaire fait également
35 référence aux variants. Le terme « lignée cellulaire » inclut également des cellules immortalisées.

Le terme cellules permissives fait référence à toutes cellules qui sont capables de propager le virus, c'est à dire des cellules qui possèdent une voie d'endocytose relayée par au moins un récepteur des lipoprotéines.

Une composition vaccinale est une composition qui comprend au moins les particules virales ou les polypeptides obtenus selon le procédé de l'invention, mais n'est pas limitée à ceux ci et couvre également les protéines recombinantes et leurs fragments qui peuvent être obtenus par les techniques de recombinaison génétique dans une cellule hôte appropriée. Une telle composition vaccinale peut comprendre, si nécessaire, un véhicule et/ou un excipient et/ou un adjuvant, à la condition qu'ils soient pharmaceutiquement acceptables.

Par « véhicule pharmaceutiquement acceptable » on entend les supports et véhicules administrables à l'être humain ou à un animal, tels que décrits par exemple dans Remington's Pharmaceutical Sciences 16th ed., Mack Publishing Co. Le véhicule pharmaceutiquement acceptable est de préférence isotonique, hypotonique ou présente une faible hypertonicité et a une force ionique relativement basse. Les définitions des excipients et adjuvants pharmaceutiquement acceptables sont également données dans Remington's Pharmaceutical Sciences précité.

Exemple 1 : Préparation du matériel biologique.

La séparation des lipoprotéines est effectuée à partir du plasma ou du sérum d'un patient à jeun depuis 12 heures et détecté positif pour le virus de l'hépatite C.

Le sang prélevé du patient est dilué au 1/100 avec une solution d'EDTA (0,15 M NaCl - 0,1 M EDTA). Le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 3500 tpm, à la température de 4°C. Le plasma est ensuite récolté et stocké à 4°C jusqu'à utilisation.

Le sang du patient est récolté sur tube sec et centrifugé pendant 10 minutes à 3000 tpm, à la température de 4°C. Le sérum est prélevé et stocké à 4°C jusqu'à utilisation.

5 (i) Obtention d'une fraction comprenant des LVPs d'une densité inférieure à 1,0063 g/ml, d'une fraction comprenant des LVPs d'une densité comprise entre 1,0063 g/ml et 1,063 g/ml, et d'une fraction comprenant des LVPs supérieure à 1,063 g/ml.

10 Le plasma et le sérum sont respectivement ultracentrifugés pendant 4 heures à 100 000 tpm, à 4°C dans un appareil TL100 commercialisé par la société Beckman et comprenant un rotor TL100.4. La fraction supérieure qui contient les LVPs de densité inférieure à
15 1,0063 g/ml est récupérée et conservée à 4°C. La fraction inférieure est ajustée à une densité de 1,063 g/ml par addition de 7,21 g de NaBr pour 100 ml de la fraction. La fraction inférieure est ensuite ultracentrifugée pendant 4 heures à 100 000 tpm, à 4°C. dans un appareil TL100
20 comprenant un rotor TL100.4. La fraction supérieure résultante contenant la fraction d'une densité comprise entre 1,0063 g/ml et 1,063 g/ml est récupérée et conservée à 4°C.

(ii) Obtention d'une fraction comprenant des LVP
25 d'une densité inférieure à 1,025 g/ml, d'une fraction comprenant des LVPs d'une densité comprise entre 1,025 g/ml et 1,063 g/ml, et d'une fraction comprenant des LVP d'une densité supérieure à 1,063 g/ml.

Le plasma et le sérum sont respectivement ajustés
30 à une densité finale de 1,025 g/ml par addition de 2,518 g de NaBr pour 100 ml. Une centrifugation est effectuée pendant 4 heures à 100 000 tpm, à 4°C sur l'appareil TL100 comprenant un rotor TL100.4.

La fraction supérieure qui contient la fraction
35 d'une densité inférieure à 1,025 g/ml est récupérée et conservée à 4°C. La fraction inférieure est ajustée à une

densité de 1,063 g/ml par addition de 4,84 g de NaBr pour 100 ml. La fraction inférieure est ensuite ultracentrifugée pendant 4 heures à 100 000 tpm, à 4°C. dans l'appareil TL100 comprenant un rotor TL100.4. La
5 fraction supérieure résultante contenant les LDLs est récupérée et conservée à 4°C.

Les différentes fractions récoltées sont ensuite dialysées pendant 18 heures à 4°C contre le tampon 0,15 M NaCl/0,24 mM EDTA. Les fractions sont ensuite récupérées
10 et filtrées sur une membrane de 0,45 µ. Un dosage de protéines est effectué par la méthode de Lowry (Sigma).

Exemple 2 : Culture cellulaire.

Le milieu de culture utilisé est le milieu DMEM
15 (commercialisé par Gibco BRL) complémenté avec : 1 mM de pyruvate de sodium (Gibco), 1% d'acides aminés non essentiels (Boehringer Mannheim), 2 mM de Glutamine (Gibco BRL), 200 U/ml de Penicilline (bioMérieux), 200 mg/ml de Streptomycine (bioMérieux) et 10% de sérum de veau
20 (Boehringer).

Les cellules proviennent de la lignée cellulaire PLC/PRF/5 (Alexander cells) (référence ATCC : CRL 8024) qui est une lignée établie d'un hépatocarcinome humain. Cette lignée, qui a intégré un génome défectif de
25 l'hépatite B, sécrète l'antigène HBs du virus de l'hépatite B mais pas de virus infectieux. Les cellules sont cultivées dans le milieu DMEM complet (Gibco-BRL) complémenté avec 10% de sérum de veau foetal précité. Les cellules sont lavées avec du PBS (Gibco-BRL) préchauffé à
30 37°C. 1 ml de DMEM complémenté avec 0,2% de BSA (Sigma) et 50 µg/ml de lipoprotéines provenant de chaque fraction ou 100 µl de sérum filtré sur une membrane de 0,45 µ sont ajoutés. Simultanément, une solution d'acide oléique dans de l'isopropanol, préparée au préalable (100 mM), est
35 ajoutée dans une gamme de concentration de 0,1 à 0,8 mM. Les cellules sont ensuite soumises à incubation pendant 3

heures à 37°C sous atmosphère de CO₂ 5%. Le milieu est ensuite remplacé par du milieu DMEM complet complémenté avec 10% de sérum de veau foetal. Les cellules sont replacées dans l'incubateur dans les conditions décrites précédemment. Les surnageants de culture sont prélevés régulièrement pour une recherche par RT-PCR du génome du virus de l'hépatite C. En parallèle, une analyse par immunofluorescence est réalisée sur les cellules infectées et contrôlée à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-protéines structurales HCV.

Exemple 3 : Résultats.

L'étude est réalisée à partir de différentes fractions de LVPs obtenues à partir de plasma de deux patients infectés par HCV. La mise en évidence de la présence du génome HCV dans ces différentes fractions a été réalisée par RT-PCR semi-nichée.

Patient	Fractions LVPs de densité d *:	1 ^{er} tour	2 nd tour
Patient n°1	d < 1,0063	+	+
	1,063 <d> 1,0063	-	-
	d > 1,063	-	+
Patient n°2	d < 1,0063	-	+
	1,063 <d> 1,0063	-	+
	d > 1,063	+	+

* : densité d en g / ml

Ces résultats montrent la présence d'un signal positif pour la présence du génome HCV dans les fractions de densité inférieure à 1,0063 g/ml, chez les deux

patients à au moins l'un des premier et second tours de PCR.

L'analyse de la fraction de densité comprise entre 1,063 et 1,0063 g/ml, est négative pour la présence du génome HCV chez les patients n°1, mais positive au deuxième tour de PCR chez le patient n°2. La fraction de densité supérieure à 1,063 g/ml est positive pour la présence du génome HCV chez les deux patients, à au moins l'un des premier et second tours de PCR, mais la réponse est plus faible pour le patient 1 que pour le patient 2. Ces différences entre le patient n°1 et le patient n°2 au niveau de la fraction de densité comprise entre 1,063 et 1,0063 g/ml, peuvent s'expliquer par une charge virale plus faible chez le patient n°1.

Des résultats ont été obtenus à partir de surnageants de culture après infection de 100 µl de sérum prélevés chez les patients n°1 et n°2 en présence ou non d'acide oléique 0,5 mM. Des contrôles négatifs ont été réalisés dans les mêmes conditions. L'analyse effectuée par RT-PCR semi-nichée, montre que pour les deux patients, la présence du génome HCV dans les surnageants de culture est détectée à une fréquence plus élevée dans les essais pour lesquels l'infection a été réalisée en présence d'oléate.

Des essais similaires, réalisés à partir des fractions de densités différentes (inférieure à 1,0063 g/ml, comprise entre 1,0063 g/ml et 1,063 g/ml et supérieure à 1,063 g/ml), confirment ces résultats et montrent que l'acide oléique facilite la voie d'endocytose des LVPs au moment de l'infection.

REVENDECATIONS

1. Procédé de culture, de propagation et de répllication *in vitro* de virus appartenant aux familles des
5 *Togaviridae* et *Flaviviridae*, selon lequel on dispose d'au moins une fraction de LVPs obtenue à partir de sérum ou de plasma d'un patient infecté par au moins un virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae*, on met en contact ladite fraction, pendant un temps
10 prédéterminé dans un milieu de culture approprié, avec des cellules permissives qui possèdent une voie d'endocytose relayée par au moins un récepteur des lipoprotéines et susceptible d'être modulée entre autres par un agent activateur, de préférence choisi parmi un acide gras
15 insaturé ou un dérivé d'un acide gras insaturé comprenant de 16 à 20 atomes de carbone ou leur mélange.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le récepteur des lipoprotéines est le LSR et/ou le
20 récepteur de surface des LDLs.

3. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel l'acide gras insaturé est choisi parmi l'acide oléique, l'acide
25 palmitoléique, l'acide linoléique, l'acide linolénique, l'acide arachidonique, l'acide trans-héxadécénoïque et l'acide élaïdique ou leurs dérivés.

4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel
30 l'acide gras est l'acide oléique qui est ajouté audit milieu de culture à une concentration comprise entre 0,1 et 1 mM, de préférence 0,5 mM.

5. Procédé selon l'une quelconque des
35 revendications précédentes, dans lequel les cellules permissives sont des cellules primaires d'hépatocytes

humains ou animaux, des cellules choisies dans le groupe des lignées cellulaires d'hépatocarcinome humain ou animal, des cellules dendritiques, des cellules macrophagiques, des cellules de Kuppfer et leurs
5 combinaisons associées ou non à des lymphocytes.

6. Procédé selon la revendication 5, dans lequel les cellules permissives sont des cellules d'hépatocarcinome humain de la lignée cellulaire
10 PLC/PRF/5.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel, le milieu de culture comprend outre les ingrédients nécessaires à la
15 culture et l'acide gras ou le dérivé d'acide gras, un agent modulateur de l'apoptose.

8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel l'agent modulateur de l'apoptose est choisi parmi les
20 interférons, les anti-interférons, en particulier les anti-interférons alpha ou beta, les anti-caspase 3, en particulier des analogues peptidiques, tels que la N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluorométhylcétone et les anticorps dirigés contre lesdits anti-caspase 3.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le milieu est le milieu DMEM ou un milieu dérivé du milieu DMEM, le milieu RPMI ou un dérivé du milieu RPMI.
25

10. Procédé selon la revendication 9, dans lequel le milieu est le milieu DMEM complémenté avec 0 à 10 mM de pyruvate de sodium, 0 à 10 % d'acides aminés non
35 essentiels, 1 à 10 mM de glutamine, 100 à 200 U/ml de pénicilline, 100 à 200 mg/ml de streptomycine et 1 à 20 % de sérum de veau.

11. Procédé selon la revendication 10, dans lequel le milieu est avantageusement complémenté avec 0,1 à 0,5 % de BSA ou avec 0,1 à 0,5 % de HSA couplée à un acide gras.

5

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel on effectue après mise en contact des cellules permissives et de ladite fraction de LVPs plusieurs passages desdites cellules permissives ainsi infectées dans des conditions telles que définies selon l'une quelconque des revendications précédentes et on met en évidence la présence dudit virus dans lesdites cellules permissives par RT-PCR et/ou par technique immunologique, telle que par immunofluorescence indirecte notamment à l'aide d'un anticorps spécifique dudit virus et/ou par cytométrie de flux.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le virus appartient à la famille des Flaviviridae et au genre des Hepacivirus.

14. Procédé selon la revendication 13, dans lequel le virus est le virus de l'hépatite C ou le virus de l'hépatite G.

15. Milieu pour la culture, la propagation et la réplication d'au moins un virus appartenant aux familles des Togaviridae et Flaviviridae, ledit milieu étant le milieu DMEM complémenté avec 0 à 10 mM de pyruvate de sodium, 0 à 10 % d'acides aminés non essentiels, 1 à 10 mM de glutamine, 100 à 200 U/ml de pénicilline, 100 à 200 mg/ml de streptomycine et 1 à 20 % de sérum de veau et avantageusement comprenant de plus 0,1 à 0,5 % de BSA ou HSA couplée à un acide gras.

16. Lignée cellulaire infectée par au moins un virus appartenant aux familles des Togaviridae et Flaviviridae, dans laquelle les cellules dans la lignée cellulaire sont des cellules permissives audit virus qui possèdent une voie d'endocytose relayée par au moins un récepteur des lipoprotéines et sont capables de propager le virus.

17. Lignée cellulaire infectée selon la revendication 16, ladite lignée étant infectée par le virus HCV ou par le virus HGV.

18. Lignée cellulaire infectée selon l'une des revendications 16 ou 17, dans laquelle le récepteur de surface des lipoprotéines est le LSR et/ou le récepteur de surface des lipoprotéines LDLs.

19. Lignée cellulaire infectée selon l'une quelconque des revendications 15 à 17, dans laquelle les cellules permissives possèdent le récepteur de surface des lipoprotéines dénommé LSR et le récepteur de surface des lipoprotéines LDLs.

20. Lignée cellulaire infectée selon l'une quelconque des revendications 16 à 19, dans laquelle les cellules sont dérivées par infection d'une cellule choisie parmi les cellules d'hépatocytes primaires humains ou animal, les cellules du groupe des lignées cellulaires d'hépatocarcinome humain ou animal, les cellules dendritiques, les cellules macrophagiques et les cellules de Kupffer.

21. Lignée cellulaire infectée selon la revendication 20, dans laquelle les cellules sont dérivées par infection d'une cellule de la lignée d'hépatocarcinome humain PLC/PRF/5.

22. Procédé pour préparer une composition pour la détection dans un échantillon d'anticorps dirigés contre au moins un virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae* qui comprend au moins une purification partielle ou totale des particules virales dudit virus ou des polypeptides obtenus à partir d'une lignée cellulaire telle que définie dans les revendications 16 à 21.

23. Procédé selon la revendication 22, dans lequel lesdites particules virales ou lesdits polypeptides sont fixés sur un support solide.

24. Procédé pour l'obtention d'anticorps ou de fragments d'anticorps dirigés contre au moins un virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et *Flaviviridae* selon lequel on immunise un animal avec des particules virales ou des polypeptides obtenus à partir d'une lignée cellulaire telle que définie dans l'une quelconque des revendications 16 à 21.

25. Composition diagnostique comprenant au moins les particules virales ou les polypeptides obtenus selon le procédé défini dans l'une quelconque des revendications 22 et 23 ou les anticorps obtenus selon le procédé défini dans la revendication 24.

26. Kit de diagnostic comprenant en outre une composition telle que définie dans la revendication 25.

27. Composition vaccinale comprenant au moins les particules virales ou les polypeptides obtenus selon le procédé défini dans la revendication 22 associé à un véhicule et/ou un excipient et/ou un adjuvant pharmaceutiquement acceptable.

28. Composition thérapeutique susceptible d'influencer de manière qualitative et/ou quantitative la propagation et la réplication *in vivo* de virus appartenant aux familles des *Togaviridae* et des *Flaviviridae* qui
5 comprend entre autre un ligand susceptible de moduler, de réprimer ou d'inhiber la voie d'endocytose relayée par au moins des récepteurs des lipoprotéines, le ligand étant choisi parmi un anticorps antagoniste dirigé contre ledit récepteur et une protéine choisie parmi les protéines
10 recombinantes solubles et les polypeptide^s de synthèse solubles se liant audit récepteur ou en ce qu'elle comprend entre autre au moins une molécule qui module, réprime ou inhibe l'expression du gène codant pour ledit récepteur ou l'activité du promoteur du gène qui code pour
15 ledit récepteur.

29. Procédé pour cribler et/ou sélectionner au moins une molécule anti-virale selon lequel on met en contact ladite molécule anti-virale et une lignée
20 cellulaire infectée telle que définie selon l'une quelconque des revendications 16 à 21.

16. Lignée cellulaire infectée par au moins un virus appartenant aux familles des Togaviridae et Flaviviridae, dans laquelle les cellules dans la lignée cellulaire sont des cellules permissives audit virus qui possèdent une voie d'endocytose relayée par au moins un récepteur des lipoprotéines et sont capables de propager le virus.

17. Lignée cellulaire infectée selon la revendication 16, ladite lignée étant infectée par le virus HCV ou par le virus HGV.

18. Lignée cellulaire infectée selon l'une des revendications 16 ou 17, dans laquelle le récepteur de surface des lipoprotéines est le LSR et/ou le récepteur de surface des lipoprotéines LDLs.

19. Lignée cellulaire infectée selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, dans laquelle les cellules permissives possèdent le récepteur de surface des lipoprotéines dénommé LSR et le récepteur de surface des lipoprotéines LDLs.

20. Lignée cellulaire infectée selon l'une quelconque des revendications 16 à 19, dans laquelle les cellules sont dérivées par infection d'une cellule choisie parmi les cellules d'hépatocytes primaires humains ou animal, les cellules du groupe des lignées cellulaires d'hépatocarcinome humain ou animal, les cellules dendritiques, les cellules macrophagiques et les cellules de Kupffer.

21. Lignée cellulaire infectée selon la revendication 20, dans laquelle les cellules sont dérivées par infection d'une cellule de la lignée d'hépatocarcinome humain PLC/PRF/5.